

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Construcción de mutantes de *Salmonella enterica* por inactivación de los genes *invG/invE* y *ssaJ/ssaK* de las islas de patogenicidad 1 y 2

Constructing *Salmonella enterica* mutants for inactivating *invG/invE* y *ssaJ/ssaK* genes from pathogenicity islands 1 and 2

Judith Velasco¹, María Araque², Juan A. Ayala³

Resumen

Para la comprensión de las bases genéticas de los mecanismos de patogenicidad de *Salmonella* se han descrito diversas metodologías para manipular el ADN genómico y generar mutantes con características particulares. En este estudio se reporta la construcción de mutantes a partir de varios serotipos de *S. enterica*, por sustitución e inactivación de los genes *invG/invE* en SPI-1 y de los genes *ssaJ/ssaK* en SPI-2 mediante la técnica de recombinasa Red del fago λ descrita por Datsenko y Wanner (2000). Los genes deletados en las SPI-1 y SPI-2 codifican para las proteínas que participan en la formación de los sistemas de secreción tipo III, responsables de la invasión y supervivencia intracelular de *S. enterica* en las células hospedadoras. Los resultados de este trabajo permitirán realizar estudios futuros *in vivo* para evaluar la posible atenuación de la virulencia de las cepas mutantes, así como aportar nuevos conocimientos sobre los mecanismos genéticos involucrados en la fisiopatogenia de las enfermedades producidas por los serovares estudiados. Además, esta técnica se recomienda para generar de manera eficiente mutantes de diferentes serotipos de *Salmonella enterica* con la finalidad de estudiar los genes cromosómicos y sus productos.

Palabras clave: recombinasa red λ , mutación, islas de patogenicidad, *Salmonella enterica*.

Abstract

Several methods have been described for manipulating and producing mutant genomic DNA having specific characteristics in an attempt to understand the genetic basis for *Salmonella* pathogenicity. This study reports the construction of mutants from several *S. enterica* serotypes, the substitution and inactivation of *invG/invE*

- 1 Licenciada en Bioanálisis, Especialista en Microbiología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela. judithvelasco2005@yahoo.es
- 2 Médico cirujano, Doctora en Ciencias Médicas Fundamentales, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela. araquemc@ula.ve
- 3 Licenciado en Ciencias Químicas (Bioquímica), Doctor en Ciencias Químicas (Bioquímica), Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" CSIC-UAM, Campus de Cantoblanco, Madrid, España. jayala@cbm.uam.es

genes in the SPI-1 gene and *ssaJ/ssaK* in the SPI-2 gene by the phage λ Red recombinase technique, as described by Datsenko and Wanner (2000). Gene deletion in SPI-1 and SPI-2 encodes proteins involved in the formation of type III secretion systems responsible for *S. enterica* invasion and intracellular survival in host cells. The results of this work will lead to *in vivo* studies evaluating the possible attenuation of mutant strain virulence and provide new insights into the genetic mechanisms involved in the pathogenesis of diseases caused by these bacteria. Moreover, this technique is recommended for efficiently generating mutants from different *S. enterica* serotypes for studying chromosomal genes and their products.

Key words: λ red recombinase, mutation, pathogenicity islands, *Salmonella enterica*.

Recibido: mayo 25 de 2010

Aprobado: octubre 7 de 2010

Introducción

Diversos factores de virulencia de *Salmonella* están codificados por genes que se encuentran agrupados en las islas de patogenicidad SPI (del inglés: *Salmonella* Pathogenicity Islands). En la actualidad se han descrito 17 SPI diferentes, de las cuales se han caracterizado 14. Sin embargo, las SPI1 y SPI2 son las que codifican los determinantes que median la invasión y la supervivencia intracelular (Darwin y Miller, 1999; Hensel, 2004; Vernikos y Parkhill, 2006; Morgan, 2007).

Para la comprensión de las bases genéticas de los mecanismos de patogenicidad de *Salmonella* se han descrito diversas metodologías para manipular el ADN genómico y generar mutantes con características particulares. Estos métodos comprenden varios procesos de recombinación, uso de enzimas de restricción y vectores suicidas (Collazo *et al.*, 1995; Boyd *et al.*, 1997; Beuzón *et al.*, 2000). No obstante, el sistema de recombinasa Red del Bacteriófago λ , propuesto por Datsenko y Wanner (2000), es un método simple y altamente eficiente para inducir mutaciones o inactivar genes en el genoma de *E. coli* y en otras bacterias Gram-negativas, a través de recombinaciones homólogas utilizando productos de PCR. Este sistema tiene la ventaja de utilizar pequeñas regiones homólogas (< 50 pb), lo que permite generar mutaciones en cualquier zona del genoma bacteriano (figura 1). Además, comparado con las técnicas clásicas de ingenie-

ría genética no utiliza enzimas de restricción ni ADN ligasas (Santoyo, 2008).

En este trabajo se reporta la construcción de mutantes a partir de varios serotipos de *S. enterica*, por sustitución e inactivación de los genes *invG/invE* en SPI-1 y de los genes *ssaJ/ssaK* en SPI-2 mediante la técnica de recombinasa Red del fago λ (figura 2). Los genes deletados en las SPI-1 y SPI-2 codifican proteínas que participan en la formación de los sistemas de secreción tipo III (SSTIII), responsables de la invasión y sobrevivencia intracelular de *S. enterica* en las células hospedadoras. Los resultados de este trabajo permitirán estudios futuros *in vivo* para evaluar la posible atenuación de la virulencia de las cepas mutantes, así como aportar nuevos conocimientos sobre los mecanismos genéticos involucrados en la fisiopatología de las enfermedades producidas por estas bacterias.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este estudio se muestran en la tabla 1. Todas las cepas fueron cultivadas en caldo y agar Luria Bertani (LB). En algunos casos los medios de cultivo fueron suplementados con 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de kanamicina (Km) o 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina (Amp) según corresponda al mutante ensayado. Los cultivos fueron incubados

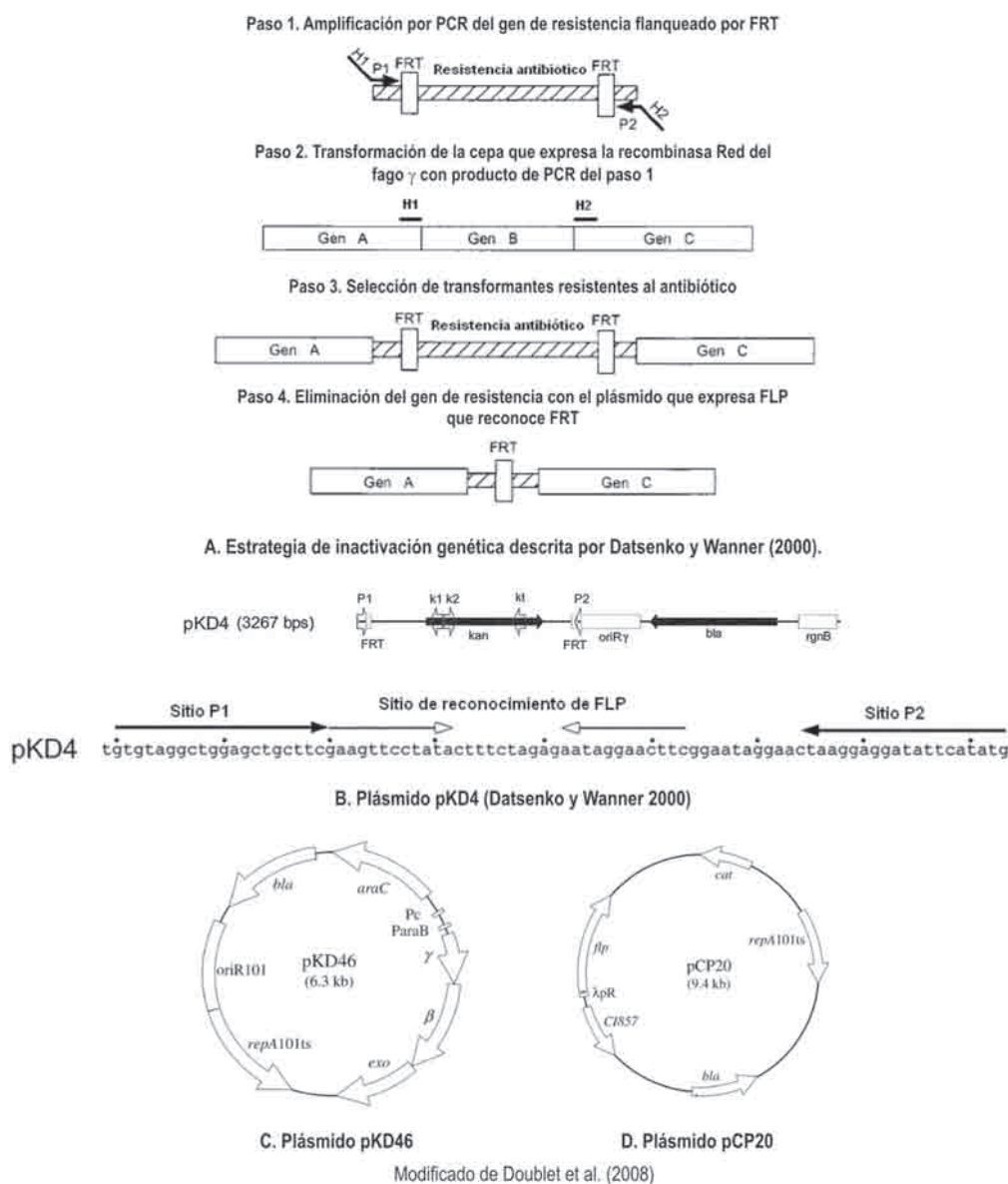


Figura 1. Metodología para la construcción de mutantes

A. Esquema de la técnica de inactivación genética empleada. Pasos 1 y 2: amplificación por PCR usando iniciadores de 56 nt de largo, que amplifican el gen de resistencia a kanamicina (Km^R) que se encuentra flanqueado por regiones FRT (Flipase Recognition Target), el vector molde se muestra en B, y regiones homólogas a los genes adyacentes al gen de interés. Paso 3: transformando con estos fragmentos de resistencia al antibiótico previamente digerido con *DpnI* y purificado estirpes bacterianas conteniendo el vector pKD46, de bajo número de copias y termosensible, que codifica para la recombinasa Red del Fago λ que se encuentra bajo el control de un promotor inducible por arabinosa (C), se seleccionaron los mutantes generados por su Km^R . Paso 4: este gen de resistencia fue luego eliminado del mutante empleando un vector termosensible que codifica para una recombinasa FLP (pCP20), el mapa del plásmido se muestra en D. B. En este se observa la representación lineal del plásmido molde empleado (pKD4), las flechas señalan la localización y orientación de los sitios de hibridación P1 y P2, así como los iniciadores de verificación k1, k2 y kt; las características específicas de cada plásmido se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos empleados en este estudio

Bacterias y plásmidos	Características	Origen o referencia
<i>Salmonella</i>		
Typhimurium SL-1344	<i>hisG</i> ; Sm ^R ; cepa de referencia (control de calidad)	Co. CBMSO
Pullorum	Cepa clínica, <i>sipA</i> , <i>invJ</i> , <i>invI</i> , <i>invH</i> , <i>hilA</i> , <i>ssaU</i> , <i>ssaD</i> , <i>ssrA/ssrB</i> , <i>sseB/sscA</i> , <i>ssaJ/ssaK</i> , Amc ^R , Te ^R	Co. ULAMM
Subespecie <i>salamae</i>	Cepa clínica, <i>sipA</i> , <i>invJ</i> , <i>invI</i> , <i>invH</i> , <i>hilA</i> , <i>ssaU</i> , <i>ssaD</i> , <i>ssrA/ssrB</i> , <i>sseB/sscA</i> , <i>ssaJ/ssaK</i> , Sm ^R , Te ^R	Co. ULAMM
Enteritidis	Cepa clínica, <i>sipA</i> , <i>invJ</i> , <i>invI</i> , <i>invH</i> , <i>hilA</i> , <i>ssaU</i> , <i>ssaD</i> , <i>ssrA/ssrB</i> , <i>sseB/sscA</i> , <i>ssaJ/ssaK</i>	Co. ULAMM
Saintpaul	Cepa clínica, <i>sipA</i> , <i>invJ</i> , <i>invI</i> , <i>invH</i> , <i>hilA</i> , <i>ssaU</i> , <i>ssaD</i> , <i>ssrA/ssrB</i> , <i>sseB/sscA</i> , <i>ssaJ/ssaK</i> , Sm ^R , Te ^R , Tic ^R	Co. ULAMM
Subespecie <i>arizonae</i>	Cepa clínica, <i>sipA</i> , <i>invJ</i> , <i>invI</i> , <i>invH</i> , <i>hilA</i> , <i>ssaU</i> , <i>ssaD</i> , <i>ssrA/ssrB</i> , <i>sseB/sscA</i> , <i>ssaJ/ssaK</i> , An ^R , Amc ^R , Caz ^R , Cxm ^R , C ^R , Sm ^R , Te ^R	Co. ULAMM
London	Cepa clínica, <i>sipA</i> , <i>invJ</i> , <i>invI</i> , <i>invH</i> , <i>hilA</i> , <i>ssaU</i> , <i>ssaD</i> , <i>ssrA/ssrB</i> , <i>sseB/sscA</i> , <i>ssaJ/ssaK</i>	Co. ULAMM
Infantis	Cepa clínica, <i>sipA</i> , <i>invJ</i> , <i>invI</i> , <i>invH</i> , <i>hilA</i> , <i>ssaU</i> , <i>ssaD</i> , <i>ssrA/ssrB</i> , <i>sseB/sscA</i> , <i>ssaJ/ssaK</i>	Co. ULAMM
Montevideo	Cepa clínica, <i>sipA</i> , <i>invJ</i> , <i>invI</i> , <i>invH</i> , <i>hilA</i> , <i>ssaU</i> , <i>ssaD</i> , <i>ssrA/ssrB</i> , <i>sseB/sscA</i> , <i>ssaJ/ssaK</i> , Sm ^R	Co. ULAMM
Dublin	Cepa clínica, <i>sipA</i> , <i>invJ</i> , <i>invI</i> , <i>invH</i> , <i>hilA</i> , <i>ssaU</i> , <i>ssaD</i> , <i>ssrA/ssrB</i> , <i>sseB/sscA</i> , <i>ssaJ/ssaK</i> , Sm ^R	Co. ULAMM
Havana	Cepa clínica, <i>sipA</i> , <i>invJ</i> , <i>invI</i> , <i>invH</i> , <i>hilA</i> , <i>ssaU</i> , <i>ssaD</i> , <i>ssrA/ssrB</i> , <i>sseB/sscA</i> , <i>ssaJ/ssaK</i>	Co. ULAMM
Typhimurium	Cepa clínica, <i>sipA</i> , <i>invJ</i> , <i>invI</i> , <i>invH</i> , <i>hilA</i> , <i>ssaU</i> , <i>ssaD</i> , <i>ssrA/ssrB</i> , <i>sseB/sscA</i> , <i>ssaJ/ssaK</i>	Co. ULAMM
Java	Cepa clínica, <i>sipA</i> , <i>invJ</i> , <i>invI</i> , <i>invH</i> , <i>hilA</i> , <i>ssaU</i> , <i>ssaD</i> , <i>ssrA/ssrB</i> , <i>sseB/sscA</i> , <i>ssaJ/ssaK</i> , An ^R , Te ^R	Co. ULAMM
Plásmidos		
pKD4	1,6 Kb. Derivado de pANT-Sy contiene regiones flanqueantes FRT del gen Km ^R ; Amp ^R	Datsenko y Wanner (2000)
pKD46	6,3 Kb. Derivado de pINT-ts contiene <i>araC</i> - <i>P_{araB}</i> y fragmentos de ADN γ β <i>exo</i> ; Amp ^R	Datsenko y Wanner (2000)
pCP20	9,4 Kb. Termosensible, expresa la recombinasa FLP; Amp ^R ; C ^R	Datsenko y Wanner (2000)

Co. CBMSO: Colección Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Universidad Autónoma de Madrid, España; Co. ULAMM: Colección Universidad de los Andes, Laboratorio de Microbiología Molecular, Mérida, Venezuela; ^R: resistente, Km: kanamicina, C: cloramfenicol, Sm: estreptomina, Tic: ticarcilina, Amc: amoxicilina/ácido clavulánico, An: ácido nalidixico, Cxm: cefuroxima, Caz: ceftazidima, Te: tetraciclina.

durante toda la noche a 37 °C en baño de agua con agitación.

Construcción de mutantes de Salmonella enterica por delección de los genes invG/invE y ssaJ/ssaK en las SPI-1 y SPI-2, respectivamente

Los mutantes de *S. enterica* en *invG/invE* y *ssaJ/ssaK* fueron construidos utilizando el sistema Red del fago λ , de acuerdo con lo descrito por Datsenko y Wanner (2000). Los iniciadores utilizados para inducir la mutagénesis de los genes *invG/invE* (SPI-1) y *ssaJ/ssaK* (SPI-2) y amplificar el gen de resistencia a la kanamicina del plásmido pKD4, se muestran en la tabla 2; estos se diseñaron con secuencias homólogas (36 nucleótidos) a la región del cromosoma adyacente a los genes objeto de delección [H1 (*invF*) y H2 (*invA*) de SPI1 y H1 (*ssaI*) y H2 (*ssaL*) de SPI2], de las SPI1 y SPI2 (número de acceso GenBank para SPI1 U08280 y para SPI2 *ssaL* Y09357, *ssaI* AJ224892) más la secuencia correspondiente a P1 y P2 del plásmido PKD4 (20 nucleótidos). Las mezclas para la amplificación se prepararon a un volumen final de 25 μ l, conteniendo 1 ng de ADN (pKD4), 1,5 U de *Taq* polimerasa (Biotools®), 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen®), 4 mM de $MgCl_2$ (Biotools®), 1 μ M de cada oligonucleótido y 1X de buffer (Biotools®). Las condiciones de amplificación fueron: inicialmente 3 min a 96 °C y luego 30 ciclos: 1,30 min a 94 °C, 2 min 60 °C y 3 min a 72 °C, con un paso de extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos amplificados fueron purificados (Wizard® SV Gel and Clean-Up System, Promega®), digeridos con *DpnI* (New England Biolabs®), nuevamente purificados y resuspendidos en agua libre de DNAsa. Estos productos fueron observados en corridas electroforéticas en geles de agarosa 0,8% (Promega®), teñidos con bromuro de etidio (Sigma®), visualizados bajo LUV y fotografiados. Como marcador de peso molecular se utilizó el fago Φ digerido con *HindIII* (Promega®).

Electrotransformación de cepas de *S. enterica*

Las cepas de *S. enterica* fueron preparadas para los ensayos de transformación de acuerdo con lo descrito por Vega y Ayala (2006) y transformadas por electroporación con el plásmido pKD46. Las células fueron pulsadas con 2500 kV y 5 ms e incubadas en medio SOC durante 1 a 2 horas a 30 °C. Las células transformadas fueron seleccionadas en agar LB suplementado con Amp e incubadas a 30 °C. Posteriormente, estas cepas que portaban el plásmido pKD46 se cultivaron en caldo 2YT a 30 °C suplementado con Amp y L-arabinosa (1mM) hasta una DO_{600nm} de 0,6. Estas células fueron preparadas para una transformación adicional con el producto de PCR repurificado inicialmente, bajo las mismas condiciones anteriormente señaladas. Las nuevas células transformadas fueron seleccionadas en agar LB con Km e incubadas a 37 °C. Una vez obtenidas las células mutantes, el plásmido pKD46 se eliminó mediante cultivo en agar LB sin Amp a 43 °C.

Comprobación de la obtención de cepas de *S. enterica* mutantes

La mutagénesis fue confirmada por PCR utilizando el ADN cromosómico de las células transformadas y los iniciadores que flanquean la secuencia *invG/invE* y *ssaJ/ssaK* (tabla 3).

Eliminación del gen Km^R de las cepas $\Delta invGE::Km$ y $\Delta ssaJK::Km$ *S. enterica*

Una vez verificada la obtención de mutantes de *S. enterica*, estas células fueron sometidas a una nueva transformación con el plásmido pCP20, bajo las condiciones señaladas. Las células transformadas fueron seleccionadas en agar LB con Amp a 30 °C. Luego, varias colonias fueron aisladas y subcultivadas sucesivamente en medio no selectivo a 43 °C, de manera de favorecer la pérdida del plásmido. Finalmente, por ensayos de PCR se comprobó que el gen de resistencia Km^R del pKD4 había

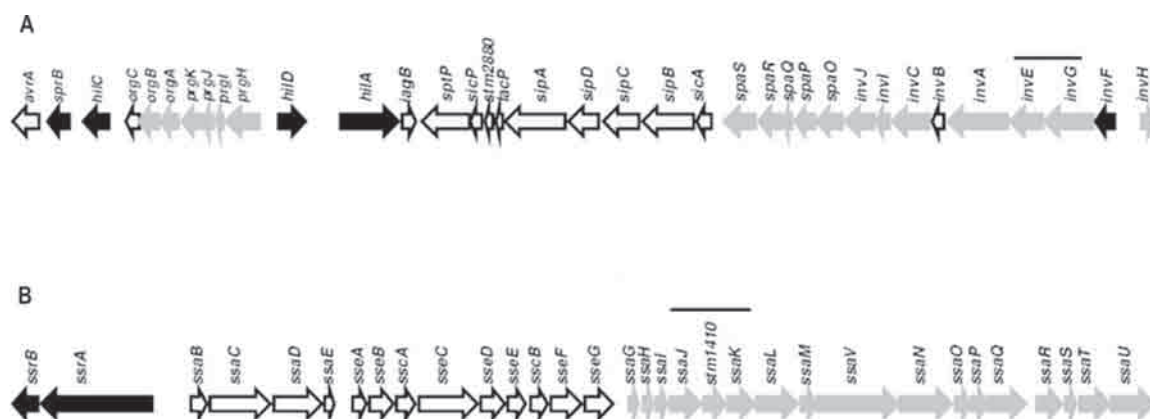


Figura 2. Organización genética de SPI1 (A) y SPI2 (B).

Los genes que codifican proteínas estructurales están en gris, los genes que codifican reguladores transcripcionales están en negro y la orientación de las flechas indica el sentido de la transcripción, la línea negra sobre el gráfico señala los genes deletados en cada SPI. Modificado de Dieyi *et al.* (2009).

sido eliminado y los genes originales estaban deletados en las cepas mutadas. En estas pruebas se utilizó el ADN cromosómico de las células transformantes y los iniciadores descritos en la tabla 3, con las mismas características

de la mezcla de amplificación antes mencionada. El programa aplicado fue el siguiente: 2 min a 93 °C y 25 ciclos: 1 min a 93 °C, 1 min a 60°C y 1 min a 72 °C, con un paso de extensión final de 10 min a 72 °C.

Tabla 2. Iniciadores usados en la inactivación de los genes en las SPI-1 y SPI-2

Iniciadores	Secuencia
SPI1/invF-H1P1	GAAATTATCAAATATTATTCAATTGGCAGACAAATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
SPI1/invA-H2P2	GATCATCACCATTAGTACCAGAATCAGTAATTCAGGCATATGAATATCCTCCTTAG
SPI2/ssal-H1P1	GTAAGCACTCAATCTTATGTAAAGTCTCTGCAGAAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
SPI2/ssal-H2P2	ATTCTGTAAATCAGGATCACTATTCTCTTCGGTAAGCATATGAATATCCTCCTTAG

Los iniciadores inv y ssa, se refieren a los genes utilizados a partir del genoma de *Salmonella*. La región denominada H1 y H2 (cursiva), permite la inserción del gen de resistencia en sentido *forward* o *reverse* por recombinación homóloga, que reconoce secuencias adyacentes a los genes por inactivar, y las regiones denominadas P1 y P2 (negrita), reconocerán secuencias en el plásmido que contiene el gen de resistencia.

Tabla 3. Iniciadores usados para verificar la inactivación de los genes en las SPI-1 y SPI-2

Iniciadores	Secuencia	Iniciadores	Secuencia
SPI1/invF/ForA	GCAATCGCTGCTGAATAGTG	SPI2/ssaG /ForB	CGCAATTTGCCTTACAGCAG
SPI1/invF/ForB	CTGAAAGCCGACACAATGAA	SPI2/ssaL/RevC	TATCCACTTCGCCAAGTTCC
SPI1/invA/RevC	CAGTGCGATCAGGAAATCAA	pKD4-K2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC
SPI2/ ssaHI/ForA	CGCTGCGTCTGTTATTTCTT	pKD4-Kt	CGGCCACAGTCGATGAATCC

Las secuencias fueron obtenidas de las regiones flanqueantes de los genes *invF*, *invA*, *ssaI*, *ssaL*, *ssaG* y *ssaL* en sentido *forward* o *reverse* (figura 2), pKD4-K2 y pKD4-Kt corresponden a la región codificante para el gen kanamicina del plásmido pKD4 en sentido forward K2 y reverse Kt.

Resultados

Obtención de cepas de S. enterica mutantes (genes deletados invG/invE y ssaJ/ssaK en las SPI-1 y SPI-2, respectivamente)

Como paso preliminar para la realización de la mutagénesis, los 12 serotipos de *S. enterica* de origen clínico y la cepa de referencia (*S. Typhimurium* SL-1344) fueron inicialmente transformadas con el plásmido pKD46, que porta la recombinasa Red del bacteriófago λ . Posteriormente, todas las cepas fueron sometidas a otro proceso de transformación, con los productos amplificados con los iniciadores diseñados para la mutagénesis: SPI1/invF-H1P1 y SPI1/invA-H2P2, SPI2/ssaI-H1P1 y SPI2/ssaL-H2P2, los cuales amplifican el gen de resistencia a la Km del pKD4 y reconocen las secuencias externas flanqueantes de la región génica, *invF* - *invA* y *ssaH*/*ssaI* - *ssaL*, de los genes *invG/invE* de la SPI-1 y los genes *ssaJ/ssaK* de la SPI-2, respectivamente. La eficiencia de transformación fue en promedio de 5-10 UFC/ml por cada serotipo de *S. enterica*. De estas células transformantes se seleccionaron dos clones representativos de cada serotipo de

Salmonella, con el objeto de comprobar la correcta sustitución de los genes mencionados, empleando los iniciadores de la tabla 3.

En las figuras 3 y 4, se muestran los productos amplificados que permitieron verificar la correcta sustitución de los genes objeto de mutación en las cepas estudiadas. Dependiendo del juego de iniciadores utilizados, el tamaño de los amplificados varió y coincidió con el valor esperado, en el caso de la mutación en la SPI1 fue de 1780 pb cuando se usaron los iniciadores (*invF*/ForA+*invA*/RevC) que reconocen las regiones génicas que flanquean los genes *invG/invE* (figura 3: A; 1.1 y 1.2). Productos de PCR más pequeños se obtuvieron cuando se emplearon los iniciadores que identifican los genes adyacentes al sitio de mutación (*invA-invF*) y el gen de Km^R: 1213 pb (*invF*/ForA+pKD4-Kt) y 1047 pb (*invA*/RevC+pKD4-K2) (figura 3: canales B y C; 1.1 y 1.2). Resultados similares se observaron en la mutagénesis realizada en la SPI2. Se generaron amplicones de 1827 pb con los iniciadores externos (*ssaHI*/ForA+*ssaL*/ForB) que reconocen las regiones génicas que flanquean los genes *ssaJ-ssaK* (figura 4: A; 1.1 y 1.2), mientras que se obtuvieron productos de 1153 pb y 1144 pb con los iniciadores específicos que amplifican los genes adyacentes a

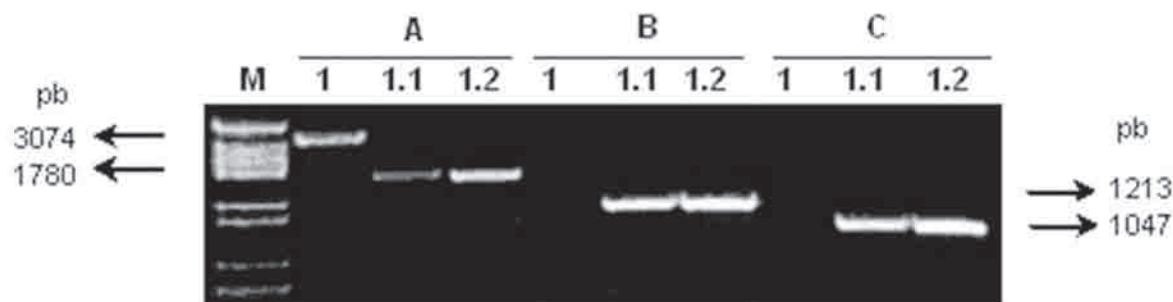


Figura 3. Electroforesis correspondiente a los productos de PCR con diferentes juegos de iniciadores para verificar la correcta sustitución de los genes *invG/invE* por el gen de resistencia a kanamicina en un serotipo representante de *Salmonella* de origen clínico. Se sustituyeron los genes *invG/invE* de la SPI1 por el gen de resistencia a kanamicina. Se utilizaron los iniciadores de verificación indicados en la tabla 3. Grupo **A**: *invF/ForA+invA/RevC* iniciadores que reconocen genes externos a los genes *invG/invE*; Grupo **B**: *invF/ForA+pKD4-Kt* y Grupo **C**: *invA/RevC+pKD4-K2*, iniciadores que reconocen genes externos y gen de Km^R ; 1: Cepa de estudio antes de la mutación, 1.1 y 1.2: clones con sustitución, M: marcador de peso molecular, fago Φ digerido con *HindIII*.

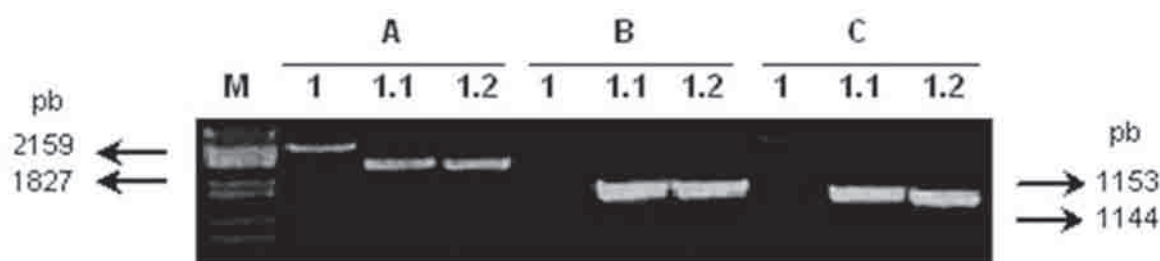


Figura 4. Electroforesis correspondiente a los productos de PCR con diferentes juegos de iniciadores para verificar la correcta sustitución de los genes *ssaJ/ssaK* por el gen de resistencia a kanamicina en un serotipo representante de *Salmonella* de origen clínico. Se sustituyeron los genes *ssaJ/ssaK* de la SPI-2 por el gen de resistencia a kanamicina. Se utilizaron los iniciadores de verificación indicados en la tabla 3. Grupo **A**: *ssaHI/ForA+ssaL/ForB*, iniciadores que reconocen genes externos a los genes *ssaJ/ssaK*; Grupo **B**: *ssaHI/ForA+pKD4-Kt* y Grupo **C**: *ssaL/RevC+ pKD4-K2* iniciadores que reconocen genes externos y gen de Km^R ; 1: Cepa de estudio antes de la mutación, 1.1 y 1.2: clones con sustitución. M: marcador de peso molecular, fago Φ digerido con *HindIII*.

ssaJ-ssaK y el gen Km^R (figura 4: B y C, canales: 1.1 y 1.2).

Eliminación del gen Km^R de las cepas $\Delta invGE::Km$ y $\Delta ssaJK::Km$ *S. enterica*

Una vez confirmada la correcta sustitución de los genes que se van a deletar por el gen de resistencia a Km , estos transformantes fueron sometidos a un último proceso de transformación con el plásmido auxiliar pCP20, que

expresa la recombinasa FLP que reconoce los sitios FRT⁺ adyacentes al gen de Km^R . Para ello se seleccionó un clon por cada serotipo de *Salmonella*. La selección de las mutantes se realizó en agar LB suplementado con Amp a 30 °C. La eficiencia de transformación fue similar a la obtenida anteriormente (5-10 UFC/ml). Las mutantes fueron sometidas a subcultivos a 43 °C para favorecer pérdida del plásmido, y seleccionadas en agar LB —el mismo número de clones que en el ensayo de sustitución—, y se verificó la correcta pérdida del gen de resis-

cia que reemplazaba a los genes *invG/invE* de la SPI-1 y los genes *ssaJ/ssaK* de la SPI-2, empleando para ello los iniciadores mencionados en la tabla 3. Dependiendo de las parejas de iniciadores utilizados se generaron fragmentos de diferentes tamaños de acuerdo con lo esperado, 194 pb (*invF/ForA+invA/RevC*) y 675 pb (*invF/For B+ invA/Rev C*) en los transformantes con delección de los genes *invG/invE* de la SPI-1 como se puede apreciar en la figura 5;

227 pb (*ssaHI/ForA+ ssaL/RevC*) y 327 pb (*ssaG/ForB+ssaL/RevC*), en los mutantes con eliminación de los genes *ssaJ/ssaK* de la SPI-2 como se observa en la figura 6.

Cada serotipo o subespecie de *Salmonella* fue sometida en forma independiente al proceso de sustitución y delección de los genes *invG/invE* en la SPI-1 y *ssaJ/ssaK* en la SPI-2. En la tabla 4 se muestra la distribución de las cepas de acuerdo con la mutación realizada.

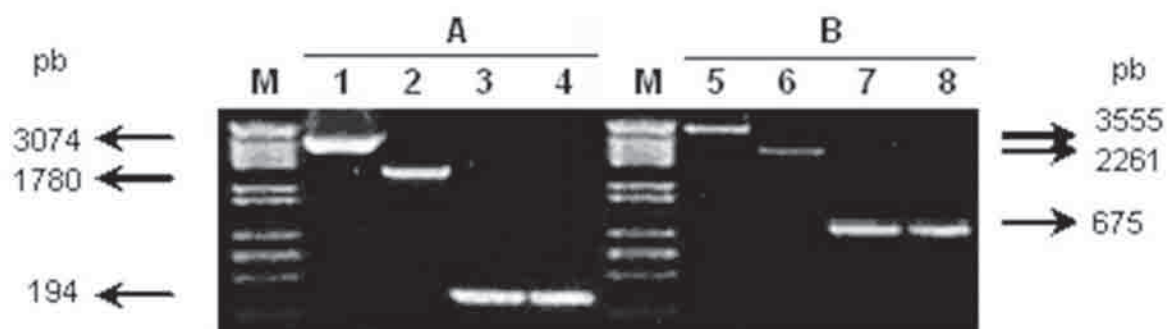


Figura 5. Electroforesis correspondiente a los productos de PCR con diferentes juegos de iniciadores para verificar la eliminación del gen de resistencia a kanamicina, y delección de los genes *invG/invE* en SPI-1 en un serotipo representante de *Salmonella* de origen clínico. Se usaron los iniciadores de verificación indicados en la tabla 3. La diferencia de tamaño en las bandas se debe a los iniciadores utilizados: Grupo **A**: *invF/ForA+invA/RevC*; Grupo **B**: *invF/For B+ invA/Rev C*. Los tamaños de bandas corresponden a la amplificación realizada sobre ADN de *Salmonella*, según el caso: 1 y 5: Cepa de estudio antes de la mutación; 2 y 6: clones con Δ *invGE::Km^R*; 3,4,7 y 8: clones con eliminación del gen *Km^R* y delección de los genes *invG/invE*; M: marcador de peso molecular, fago Φ digerido con *HindIII*.

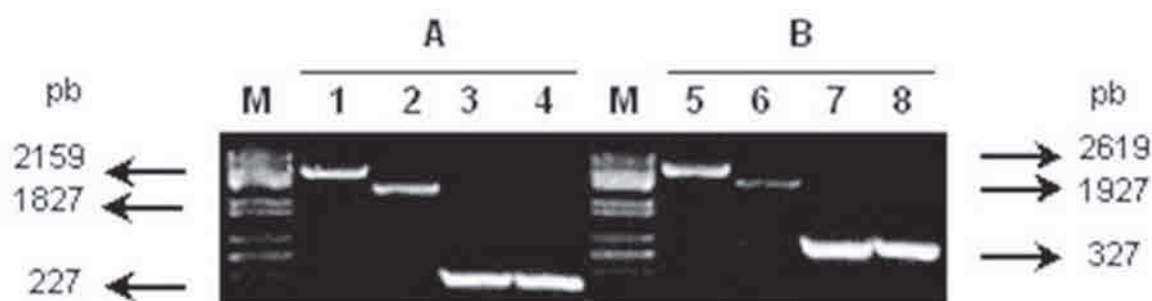


Figura 6. Electroforesis correspondiente a los productos de PCR con diferentes juegos de iniciadores para verificar la eliminación del gen de resistencia a kanamicina y delección de los genes *ssaJ/ssaK* en SPI-2 en un serotipo representante de *Salmonella* de origen clínico. Se usaron los iniciadores de verificación indicados en la tabla 3. La diferencia de tamaño en las bandas se debe a los iniciadores utilizados: Grupo **A**: *ssaHI/ForA+ ssaL/RevC*; Grupo **B**: *ssaG/ForB+ssaL/RevC*. Los tamaños de bandas corresponden a la amplificación realizada sobre ADN de *Salmonella*, según el caso: 1 y 5: Cepa de estudio antes de la mutación; 2 y 6: clones con Δ *ssaJK::Km^R*; 3,4,7 y 8: clones con eliminación de gen *Km^R* y delección de los genes *ssaJ/ssaK*; M: marcador de peso molecular, fago Φ digerido con *HindIII*.

Discusión

La disposición de técnicas efectivas para realizar mutaciones puntuales en el cromosoma bacteriano contribuye de manera significativa en la comprensión de las implicaciones de diversos genes en la patogenia de un microorganismo (Murphy y Campellone, 2003). Al respecto, el sistema de la recombinasa Red del bacteriófago λ , propuesto por Datsenko y Wanner (2000), ofrece una alternativa rápida y eficiente para realizar mutaciones dirigidas e inactivar genes en el genoma de bacterias Gram- negativas, por medio de recombinaciones homólogas, en un solo paso, utilizando productos de PCR. Los resultados obtenidos en este estudio así lo demuestran; 13 cepas de diversos serotipos de *S. enterica* fueron delecionadas en forma independiente en los genes *invG/invE* de SPI-1 y *ssaJ/ssaK* de SPI-2. Para ello se utilizaron amplicones obtenidos a partir de dos juegos de iniciadores específicamente diseñados para una mutagénesis puntual (SPI1/*invF*-

H1P1 y SPI1/*invA*-H2P2, SPI2/*ssaI*-H1P1 y SPI2/*ssaL*-H2P2).

Los genes deletados en las cepas estudiadas son considerados no esenciales, debido a que no afectan el desarrollo o la viabilidad de la bacteria. Sin embargo, son genes que se encuentran en las dos principales islas de patogenidad (SPI1 y SPI2) de *Salmonella*, y son fundamentales para la virulencia de esta bacteria. Estos genes *invG/invE* y *ssaJ/ssaK* codifican para proteínas que participan en la formación de los sistemas de secreción tipo III (SSTIII) en *Salmonella* y median la invasión y supervivencia intracelular de la bacteria en la célula hospedera. Estudios similares fueron reportados por Murphy y Campellone (2003), quienes con una metodología similar a la descrita en este trabajo, lograron deleccionar con precisión genes (*eae*, *tir* y el operón *eae-cesT-tir*) en islas de patogenidad (O-islands) de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) y enteropatógena (ECEP). Por otra parte, Klumpp y Fuchs (2007), utilizando el sistema de la recombinasa Red del fago λ , identificaron genes nuevos en la

Tabla 4. Serotipos de *Salmonella enterica* mutadas en SPI-1 y SPI-2

Cepas de origen clínico	Mutantes en SPI-1	Mutantes en SPI-2
<i>Salmonella</i> Pullorum	$\Delta invGE$ <i>S. Pullorum</i>	$\Delta ssaJK$ <i>S. Pullorum</i>
<i>S. subespecie salamae</i>	$\Delta invGE$ <i>S. subespecie salamae</i>	$\Delta ssaJK$ <i>S. subespecie salamae</i>
<i>S. Enteritidis</i>	$\Delta invGE$ <i>S. Enteritidis</i>	$\Delta ssaJK$ <i>S. Enteritidis</i>
<i>S. Saintpaul</i>	$\Delta invGE$ <i>S. Saintpaul</i>	$\Delta ssaJK$ <i>S. Saintpaul</i>
<i>S. subespecie arizonae</i>	$\Delta invGE$ <i>S. subespecie arizonae</i>	$\Delta ssaJK$ <i>S. subespecie arizonae</i>
<i>S. London</i>	$\Delta invGE$ <i>S. London</i>	$\Delta ssaJK$ <i>S. London</i>
<i>S. Infantis</i>	$\Delta invGE$ <i>S. Infantis</i>	$\Delta ssaJK$ <i>S. Infantis</i>
<i>S. Montevideo</i>	$\Delta invGE$ <i>S. Montevideo</i>	$\Delta ssaJK$ <i>S. Montevideo</i>
<i>S. Dublin</i>	$\Delta invGE$ <i>S. Dublin</i>	$\Delta ssaJK$ <i>S. Dublin</i>
<i>S. Havana</i>	$\Delta invGE$ <i>S. Havana</i>	$\Delta ssaJK$ <i>S. Havana</i>
<i>S. Typhimurium</i>	$\Delta invGE$ <i>S. Typhimurium</i>	$\Delta ssaJK$ <i>S. Typhimurium</i>
<i>S. Java</i>	$\Delta invGE$ <i>S. Java</i>	$\Delta ssaJK$ <i>S. Java</i>
Cepa de referencia		
<i>S. Typhimurium</i> SL-1344	$\Delta invGE$ <i>S. Typhimurium</i> SL-1344	$\Delta ssaJK$ <i>S. Typhimurium</i> SL-1344

isla genómica SPI-6 de *S. Typhimurium*, la cual contribuye en la multiplicación de esta bacteria en los macrófagos.

Aunque el sistema de la recombinasa Red del fago λ , permite inactivar por lo menos un gen de interés, como el descrito en este trabajo, la eficiencia de este método ha permitido la delección hasta de una isla de patogenicidad completa como lo reportan Dieye *et al.* (2009), quienes lograron obtener mutantes de *S. Typhimurium* en SPI1 y SPI2. Además, la versatilidad de este sistema ha sido comprobada en este estudio al producir mutaciones sitio-específicas en serotipos de *Salmonella* de origen clínico diferentes al Typhimurium, Enteritidis o Cholerasis (Cox *et al.*, 2007; Domínguez-Bernal *et al.*, 2008; Dieye *et al.*, 2009). En este contexto, el sistema de la recombinasa Red ha extendido su utilidad en bacterias diferentes a las de la familia *Enterobacteriaceae*, tal es el caso de la inactivación del gen *aroA* en *Pasteurella multocida* (Zare *et al.*, 2008) y en la modificación y delección de genes en *Vibrio cholerae* (Yamamoto *et al.*, 2009).

Conclusiones

La metodología descrita por Datsenko y Wanner (2000), es aplicable para la realización de una mutagénesis dirigida por reemplazo y delección de genes de virulencia en las SPI1 y SPI2 de diferentes serotipos de *S. enterica* de origen clínico. Este es el primer reporte del empleo exitoso de esta técnica en serotipos diferentes a *S. Typhimurium*, Enteritidis y Cholerasis.

Los resultados obtenidos en este trabajo permitirán estudios futuros *in vivo* para evaluar la posible atenuación de la virulencia en mutantes de *S. enterica*, así como aportar nuevos conocimientos sobre los mecanismos genéticos involucrados en la fisiopatogenia de las enfermedades producidas por los serovares estudiados y la posible construcción de cepas para el desarrollo de vacunas.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento al doctor Francisco García del Portillo del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) Madrid, España, por facilitar parte del material biológico utilizado en este estudio, y al doctor Daniel Vega por su asesoramiento en el desarrollo de la metodología.

Este estudio fue financiado por el proyecto ALFA Bacterialnet (Contrato II-531-FC-FA-FCD-FI), Fundación para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología (Fundacite) Mérida, Venezuela (Contrato CF-07-10 y CF-09-04); el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela (Códigos FA-419 - 07 - 07 - B y CVI-ADG-FA-02-97) y el Ministerio de Ciencia e Innovación (Micinn), España (proyecto BFU2006-04574/BMC).

Referencias bibliográficas

- Beuzón, C. R., Meresse, S., Unsworth, K., Ruiz-Albert, J., Garvis, S., Waterman *et al.* 2000. *Salmonella* maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA. *The EMBO Journal* **19** (13): 3235-3249.
- Boyd, F., Li, J., Ochman, H., Selander, R. 1997. Comparative Genetics of the *inv-spa* Invasion Gene Complex of *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology* **19** (6): 1985-1991.
- Collazo, C., Zierier, M., Galan, J. 1995. Functional analysis of the *Salmonella typhimurium* invasion genes *invL* and *invJ* and identification of a target of the protein secretion apparatus encoded in the *inv* locus. *Molecular Microbiology* **15** (1): 25-38.
- Cox, M., Layton, S., Jiang, T., Cole, K., Hargis, B., Berghman, L., Bottje, W., Kwon, Y. 2007. Scarless and site-directed mutagenesis in *Salmonella enteritidis* chromosome. *BMC Biotechnology*. **7**: 59. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/7/59>
- Darwin, K., Miller, V. 1999. Molecular Basis of the Interaction of *Salmonella* with the Intestinal Mucosa. *Clinical Microbiology Reviews* **12** (3): 405-428.
- Datsenko, K. A., Wanner, B. L. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy*

- of Sciences of the United States of America (PNAS). 97: 6640-6645.
- Dieye, Y., Ameiss, K., Mellata, M., Curtiss, R. 2009. The Salmonella Pathogenicity Island (SPI) 1 contributes more than SPI2 to the colonization of the chicken by Salmonella enterica serovar Typhimurium. BMC Microbiology. 9:3. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/9/3>
- Domínguez-Bernal, G., Tierrez, A., Bartolomé, A., Martínez-Pulgarín, S., Salguero, F. J., Orden, J. A., De la Fuente, R. 2008. *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis derivatives harbouring deletions in *rpoS* and *phoP* regulatory genes are attenuated in pigs, and survive and multiply in porcine intestinal macrophages and fibroblasts, respectively. *Veterinary Microbiology* 130 (3-4): 298-311.
- Doublet, B., Douard, G., Targant, H., Meunier, D., Madec, J., Cloeckaert, A. 2008. Antibiotic marker modifications of λ Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains. *Journal of Microbiological Methods*, 75: 359-361.
- Hensel, M. 2004. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *International Journal of Medical Microbiology* 294: 95-102.
- Klump, J., Fuchs, T. 2007. Identification of novel genes in genomic islands that contribute to *Salmonella typhimurium* replication in macrophages. *Microbiology* 153, 1207-1220. Disponible en: <http://mic.sgmjournals.org/cgi/reprint/153/4/1207>
- Morgan, E. 2007. *Salmonella* pathogenicity islands. En: Rhen, M., Maskell, D., Mastroeni, P., Threlfall, J. *Salmonella* molecular biology and pathogenesis. *Horizon Bioscience*, UK.
- Murphy, K. C., Campellone, K. G. 2003. Lambda Red-mediated recombinogenic engineering of enterohemorrhagic and enteropathogenic E. coli. BMC Molecular Biology. 4: 11. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2199/4/11>.
- Santoyo, G. 2008. Recombinería en bacterias: ingeniería del ADN usando recombinación homóloga. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 50 (1-2): 38-47.
- Vega, D., Ayala, J. 2006. The DD-carboxypeptidase activity encoded by *pbp4B* is not essential for the cell growth of *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology* 185: 23-27.
- Vernikos, G., Parkhill, J. 2006. Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the *Salmonella* pathogenicity islands. *Bioinformatics* 22 (18): 2196-2203.
- Zare, P., Tabatabaei, M., Yousefbeygi, G., Jabbari, A. 2008. Using Red Recombinase and PCR Product for One-Step in-Frame Inactivation of *aroA* Gene in *Pasteurella multocida* A: 1 and Evaluation of Pathogenicity and Immunogenicity. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 7 (9): 1155-1159.
- Yamamoto, S., Izumiya, H., Masatomo, M., Arakawa, E., Watanabe, H. 2009. Application of λ Red recombination system to *Vibrio cholerae* genetics: Simple methods for inactivation and modification of chromosomal genes. *Gene* 438: 57-64.